

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09315947  
PUBLICATION DATE : 09-12-97

APPLICATION DATE : 13-03-97  
APPLICATION NUMBER : 09059404

APPLICANT : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD;

INVENTOR : TAMAOKI TATSUYA;

INT.CL. : A61K 7/06 A61K 38/55

TITLE : HIRE GROWING AND RESTORING AGENT

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a safe and effective hair growing and restoring agent by containing a specific inhibitor against a protein kinase C.

SOLUTION: This hair growing and restoring agent contains a specific inhibitor against a protein kinase C (e.g. polymyxin B) having  $\geq 3.0$ , preferably  $3.0 \cdot 10^9$  of a ratio of a 50% inhibiting constant against protein kinase A to a that against protein kinase C in an amount of  $10^{-6}$ -10wt.% as a single substance or a mixture. This agent can be prepared to a liquid state such as a hair liquid, a hair tonic or a hair lotion, or a solid state such as an ointment or a hair cream. This agent is precutaneously administrated daily in an amount of 0.5-5mL, preferably 1-3mL per one time in a frequency of single time top several times for an adult as a tonic containing the hair growing and restoring agent.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Office of Japan

00000000  
00000000

APPLICATION NUMBER  
PUBLICATION DATE

00000000  
00000000

INVENTOR  
PUBLICATION DATE

APPLICANT: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

INVENTOR: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

INVENTOR: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

INVENTOR: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

INVENTOR: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

INVENTOR: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

INVENTOR: KYOKA HAKKO KOGYO CO. LTD.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-315947

(43) 公開日 平成9年(1997)12月9日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 7/06 38/55	A E D		A 6 1 K 7/06 37/64	A E D

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-59404

(22) 出願日 平成9年(1997)3月13日

(31) 優先権主張番号 特願平8-75903

(32) 優先日 平8(1996)3月29日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72) 発明者 高橋 知也

茨城県土浦市荒川沖西区2-403-1-102

(72) 発明者 横尾 義春

茨城県牛久市牛久町3010-34

(72) 発明者 神谷 俊一

東京都町田市木曽町466-5

(72) 発明者 白井 章雄

神奈川県川崎市麻生区王禅寺2625

(72) 発明者 玉沖 達也

東京都町田市本町田2662-13

(54) 【発明の名称】 育毛剤

(57) 【要約】

【課題】 本発明により安全で有効な育毛剤を提供する。

【解決手段】 プロテインキナーゼC特異的阻害剤を配合することを特徴とする育毛剤を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】プロテインキナーゼC特異的阻害剤を配合することを特徴とする育毛剤。

【請求項2】プロテインキナーゼC特異的阻害剤が、プロテインキナーゼAの50%阻害定数とプロテインキナーゼCの50%阻害定数との比が3.0以上であるプロテインキナーゼ阻害剤である、請求項1記載の育毛剤。

【請求項3】プロテインキナーゼC特異的阻害剤が、プロテインキナーゼAの50%阻害定数とプロテインキナーゼCの50%阻害定数との比が3.0から $10^9$ であるプロテインキナーゼ阻害剤である、請求項1記載の育毛剤。

【請求項4】プロテインキナーゼC特異的阻害剤が、プロテインキナーゼAの50%阻害定数とプロテインキナーゼCの50%阻害定数との比が $10^4$ から $10^9$ であるプロテインキナーゼ阻害剤である、請求項1記載の育毛剤。

【請求項5】プロテインキナーゼC特異的阻害剤が、ポリミキシンB、カルフォスチンC、パルミトイルカルニチン、ヘキサデシルフォスフォコリンおよびそれらの薬理学的に許容される塩から選ばれるプロテインキナーゼ阻害剤である、請求項1、2、3または4記載の育毛剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はプロテインキナーゼC特異的阻害剤を配合することを特徴とする育毛剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】プロテインキナーゼ阻害活性を持った物質、3-アミノ/ハイドロキシ-4-[4-ベンゾイル-フェニル カルボキニルアミノ/オキシ]アゼパン類が毛髪の成長を刺激するとの記載があるが(EP663393 A1)、該プロテインキナーゼ阻害剤はプロテインキナーゼC(以下、PKCと略す)阻害活性と同時にプロテインキナーゼA(以下、PKAと略す)の阻害活性を有している。

【0003】毛包器官培養の系において、PKCの活性化物質である12-O-テトラガロイルフォルボール-13-アセテートによる育毛抑制作用を、PKC阻害剤であるH-7[1-(5-Isoquinoliny)sulfonyl]-2-methyl piperazine]が解除することが知られている〔ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・デルマトロジー(British Journal of Dermatology), 133, 5, 686-693(1995)〕。該H-7はPKC阻害活性と同時にPKAの阻害活性を有していることが知られている〔バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 8, 732 (1990)〕。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】毛包器官培養の系において、12-O-テトラガロイルフォルボール-13-

アセテートによる育毛抑制作用を、PKC阻害剤であるH-7は解除するが、該PKC阻害剤による育毛促進活性は認められていない〔British Journal of Dermatology, 133, 5, 686-693(1995)〕。

【0005】本発明において、PKC阻害活性と同時にPKAの阻害活性を有しているプロテインキナーゼ阻害剤では必ずしも十分な育毛効果は期待できず、PKC特異的阻害剤が優れた育毛効果を有するという知見を得た。該知見に基づき、H-7や3-アミノ/ハイドロキシ-4-[4-ベンゾイル-フェニル カルボキニルアミノ/オキシ]アゼパン類はPKC阻害活性と同時にPKAの阻害活性を有しているため、必ずしも十分な育毛効果は期待できない。

【0006】これまで、育毛効果を有するPKC特異的阻害剤に関しては知られていない。本発明の目的は、PKC特異的阻害剤を含む安全で有効な育毛剤を提供することである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明により、プロテインキナーゼC特異的阻害剤を含む育毛剤を提供する。本発明で言うプロテインキナーゼC特異的阻害剤は、できるだけPKA阻害活性を有さず、PKC阻害活性を有するプロテインキナーゼ阻害剤であり、PKC阻害活性とPKA阻害活性を以下に示すPKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法で測定したとき、PKAの50%阻害定数(以下、 $PKA-IC_{50}$ と略す)とPKCの50%阻害定数(以下、 $PKC-IC_{50}$ と略す)の比(以下、 $PKA-IC_{50}/PKC-IC_{50}$ と略す)が3.0以上であるプロテインキナーゼ阻害剤である。

【0008】PKA阻害活性の低いプロテインキナーゼ阻害剤の場合、下記PKA阻害活性測定法において多量のプロテインキナーゼ阻害剤が必要となり、該プロテインキナーゼ阻害剤が溶解可能な濃度までしか阻害活性は測定できないため、数値として定義できる $PKA-IC_{50}/PKC-IC_{50}$ の値はおおよそ $10^9$ となるが、本発明のプロテインキナーゼ阻害剤は、 $PKA-IC_{50}/PKC-IC_{50}$ の値が3以上であれば、定義できる $PKA-IC_{50}/PKC-IC_{50}$ の値に限定されるものではない。

【0009】本発明で好ましいプロテインキナーゼ阻害剤としては、 $PKA-IC_{50}/PKC-IC_{50}$ が $10^4$ から $10^9$ のプロテインキナーゼ阻害剤をあげることができる。

## (1) PKC阻害活性測定法

PKCの阻害活性の測定は、吉川らの方法〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry), 257, 13341 (1982)〕に準じて行うことができる。

【0010】2.5  $\mu$ mol 酢酸マグネシウム、50  $\mu$ g ヒストンタイプIII S (シグマ社製)、20  $\mu$ g ホス

ファチジルセリン、 $0.8 \mu\text{g}$  ダイオレイシ、 $25 \text{ nmol}$  塩化カルシウム、 $5 \mu\text{g}$  粗酵素（吉川らの方法によりラットの脳より部分精製したもの）および  $5 \mu\text{mol}$  トリス塩酸緩衝液（ $\text{pH} 7.5$ ）を含む  $250 \mu\text{l}$  溶液に  $10 \mu\text{l}$  の検体を加え、 $30^\circ\text{C}$  で3分間インキュベートする。

【0011】インキュベート後、 $1.25 \text{ nmol}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP ( $5 \sim 1.0 \times 10^3 \text{ cpm/nmol}$ ) を加え、 $30^\circ\text{C}$  で3分間リン酸化反応を行い、25%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。該反応液を酢酸セルロース膜（ポアサイズ  $0.45 \mu\text{m}$ ）（東洋濾紙社製）で濾過し、5%トリクロロ酢酸で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定し検体値とする。

【0012】また、上記操作を検体を加えないで行い、放射活性を測定し対照値とする。対照値に対して50%の検体値を示すときの検体のモル濃度をPKCの50%阻害定数（ $\text{PKC-IC}_{50}$ ）とする。

#### （2）PKA阻害活性測定法

PKAの阻害活性の測定は、クオ（Kuo）らの方法〔バイオケミストリー（Biochemistry）64, 1349（1969）〕に準じて行うことができる。

【0013】 $5 \mu\text{mol}$  トリス塩酸緩衝液（ $\text{pH} 6.8$ ）、 $2.5 \mu\text{mol}$  酢酸マグネシウム、 $100 \mu\text{g}$  ヒストンタイプII（シグマ社製）、 $0.25 \text{ nmol}$  c-AMPおよび  $200 \mu\text{g}$  粗酵素〔クオ（Kuo）らの方法により子牛の心臓より部分精製したもの〕を含む  $250 \mu\text{l}$  の溶液に  $10 \mu\text{l}$  の検体溶液を加え、 $30^\circ\text{C}$  で3分間インキュベートする。

【0014】インキュベート後、 $1.25 \text{ nmol}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP ( $5 \sim 1.0 \times 10^3 \text{ cpm/nmol}$ ) を加え、 $30^\circ\text{C}$  で3分間リン酸化反応を行い、25%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。該反応液を酢酸セルロース膜（ポアサイズ  $0.45 \mu\text{m}$ ）（東洋濾紙社製）で濾過し、5%トリクロロ酢酸で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定し検体値とする。

【0015】また、上記操作を検体を加えないで行い、放射活性を測定し対照値とする。対照値に対して50%の検体値を示すときの検体のモル濃度をPKAの50%阻害定数（ $\text{PKA-IC}_{50}$ ）とする。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】本発明のプロテインキナーゼC特異的阻害剤としては、 $\text{PKA-IC}_{50}/\text{PKC-IC}_{50}$  が3.0以上であるプロテインキナーゼ阻害剤であればいずれも用いることができる。例えば、 $\text{PKA-IC}_{50}/\text{PKC-IC}_{50}$  が3から  $10^9$  であるプロテインキナーゼ阻害剤をあげることができ、好ましくは、 $\text{PKA-IC}_{50}/\text{PKC-IC}_{50}$  が  $10$  から  $10^9$  であるプロテインキナーゼ阻害剤をあげることができる。

【0017】具体的な例としては、ポリミキシンB、カルフォスチンC、パルミトイル-DL-カルニチン、ヘ

キサデシルフォスフォコリン（ミルテフォシン、シグマ社製）等をあげることができる。また、それらの薬理学的に許容される塩をあげることができる。薬理学的に許容される塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、蟻酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などをあげることができる。

【0018】育毛剤の剤型は、本発明のプロテインキナーゼC特異的阻害剤を配合しうる剤型であればどのような剤型をも用いることができる。適当な医薬基剤と配合して液状あるいは固体状の育毛剤として用いることができる。液状あるいは固体状の育毛剤型としては、ヘヤーリキッド、ヘヤートニック、ヘヤーローション等の液状剤型、軟膏、ヘヤクリーム等の固体状剤型があげられ、各々好適な基剤に本発明のプロテインキナーゼ阻害剤を添加し、常法により製造することができる。

【0019】本発明の育毛剤中のプロテインキナーゼC特異的阻害剤の配合量は阻害活性の強さや物性に由来する経皮吸収性によって大きく異なるが、単独または混合物として通常  $10^{-6} \sim 10$  重量%（以下、単に%という）の範囲である。液体状剤型に好適な基剤としては、育毛剤に通常使用されているもの、例えば精製水、エタノール、多価アルコール類、油脂類等があげられ、必要により添加剤を添加してもよい。

【0020】多価アルコール類としては、グリセロール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール等があげられる。油脂類としては小麦胚芽油、椿油、ホホバ油、オリーブ油、スクワラン、サフラワー油、マカデミアナッツ油、アボガド油、大豆水添レシチン等があげられる。

【0021】添加剤としては、香料、界面活性剤、殺菌剤等があげられる。また、酸化防止剤、ホルモン類、紫外線吸収剤、消炎剤、清涼剤、保湿剤、ビタミン類、生薬エキス、チンキ類等も適宜添加してもよい。香料としては、通常化粧料等に用いるものであれば、どのような香料を用いてもよい。

【0022】界面活性剤としては、ポリオキシエチレン（60）硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン（8）オレイルエーテル、ポリオキシエチレン（10）オレイルエーテル、モノオレイン酸ポリオキシエチレン（10）、ポリオキシエチレン（30）グリセリルモノステアレート、モノステアリン酸ソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレン（30）グリセリル、モノオレイン酸ポリオキシエチレン（20）ソルビタン、ショ糖脂肪酸エステル、モノオレイン酸ヘキサグリセリン、モノラウリン酸ヘキサグリセリン、ポリオキシエチレン還元ラノリン、ポリオキシエチレン（20）ラノリンアルコール、ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イ

ソステアリン酸ジエステル、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル等があげられる。

【0023】殺菌剤としては、トリクロロヒドロキシジフェニルエーテル、ヒノキチオール、トリクロサン、クロルヘキシジグロコン酸塩、フェノキシエタノール、レゾルシン、イソプロピルメチルフェノール、アズレン、サリチル酸、ジンクピリチオン、塩化ベンザルコニウム、感光素301号、モノニトログアヤコールナトリウム等があげられる。

【0024】酸化防止剤として、ブチルヒドロキシアニソール、没食子酸プロピル、エリソルビン酸等があげられる。ホルモン類としては、エチニルエストラジオール、エストロン、エストラジオール等があげられる。紫外線吸収剤としては、ジヒドロキシベンゾフェノン等のベンゾフェノン類、メラニン、パラアミノ安息香酸エチル、パラジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシルエステル、シノキサート、パラメトキシ桂皮酸 2-エチルヘキシルエステル、2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾール、ウロカニン酸、金属酸化物微粒子等があげられる。

【0025】消炎剤としては、グリチルリチン酸ジカリウム、 $\beta$ -グリチルレチン酸、アラントイン、塩酸ジフェンヒドラミン、グアイアズレン、1-メントール等があげられる。清涼剤としては、トウガラシチンキ、1-メントール等があげられる。保湿剤としては、L-ピロリドンカルボン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸等があげられる。

【0026】ビタミン類としては、酢酸dl- $\alpha$ -トコフェロール、dl- $\alpha$ -トコフェロール、d- $\delta$ -トコフェロール、ビタミンE、ニコチン酸ベンジル、ニコチン酸アミド、D-パントテニルアルコール、パントテニルエチルエーテル、ビオチン、塩酸ピリドキシン、リボフラビン等が挙げられる。生薬エキスとしては、センブリエキス、ニンニクエキス、ニンジンエキス、アロエエキス、キナエキス等があげられる。

【0027】チンキ類として、トウガラシチンキ、ショウキョウチンキ、カンタリスチンキ等が挙げられる。上記の液体状剤型を噴霧剤として用いるときは、不燃化液化ガス等を用いることができる。固体状剤型の基剤としては、ワセリン、固形パラフィン、植物油、鉱物油、ラノリン、ろう類、マクロゴール等があげられ、必要により前記の添加剤、レシチン等の乳化剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール等の低級アルコールを添加してもよい。

【0028】本発明の育毛剤の投与量は年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、成人一人当たり一回に育毛剤トニックとして0.5~5ml、好ましくは1~3ml量の範囲で一日一回から数回、経皮投与される。以下、実施例、参考例、試験例により、本発明を具体的に説明する。

## 【0029】

### 【実施例】

実施例1. 育毛トニック1の作製。

エチルアルコール55g、1, 3-ブチレングリコール7g、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル0.5g、ポリオキシエチレン(25)グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル0.25gを均一に混合攪拌し、溶液Aを調製した。

【0030】また、ポリミキシンB硫酸(シグマ社製)0.3g、精製水36.95gを均一に混合攪拌し、溶液Bを調製した。溶液Bを溶液Aに攪拌しながら加え均一にし育毛トニック(組成物1)を調製した。

【0031】実施例2. 育毛トニック2の作製。

エチルアルコール90g、1, 3-ブチレングリコール5g、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル0.5g、ポリオキシエチレン(25)グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル0.25g、カルフォスチンC(協和発酵工業株式会社製)0.03gを均一に混合攪拌し、溶液Aを調製した。該溶液Aに精製水4.22gを攪拌しながら加え均一にし、育毛トニック(組成物2)を調製した。

【0032】実施例3. 育毛トニック3の作製。

エチルアルコール77g、1, 3-ブチレングリコール10g、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル0.5g、ポリオキシエチレン(25)グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル0.25g、パルミトイル-DL-カルニチン塩酸(シグマ社製)3gを均一に混合攪拌し、溶液Aを調製した。該溶液Aに精製水9.25gを攪拌しながら加え均一にし育毛トニック(組成物3)を調製した。

【0033】実施例4. 育毛トニック4の作製。

エチルアルコール70g、1, 3-ブチレングリコール10g、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル0.5g、ポリオキシエチレン(25)グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル0.25g、ヘキサデシルフォスフォコリン(シグマ社製)1gを均一に混合攪拌し、溶液Aを調製した。該溶液Aに精製水18.25gを攪拌しながら加え均一にし育毛トニック(組成物4)を調製した。

【0034】参考例1. PKC-IC<sub>50</sub>およびPKA-IC<sub>50</sub>の測定

ポリミキシンB硫酸、カルフォスチンC、パルミトイル-DL-カルニチン塩酸およびヘキサデシルフォスフォコリンについて、PKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法に従ってPKC阻害活性およびPKA阻害活性を測定し、PKC-IC<sub>50</sub>およびPKA-IC<sub>50</sub>を求めた。結果を第1表に示した。

【0035】

【表1】

第 1 表

検体	PKC-IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PKA-IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PKA-IC <sub>50</sub> PKC-IC <sub>50</sub>
ポリミキシンB硫酸	10	> 100	> 10
カルフォスチンC	0.05	> 50	> 1000
パルミチル-DL-カルニチン塩酸	100	> 300	> 3
ヘキサフルオロアリスリル(ミルフィオン)	94	> 1000	> 10.6
H-7 <sup>*)</sup>	15	13	0.87
K252a <sup>*)</sup>	0.02	0.02	1
スタウロスボリン <sup>*)</sup>	0.0027	0.0054	2

<sup>\*)</sup> : 文献[BIO/TECHNOLOGY, 8, 732 (1990)]より引用。

【0036】参考例2. スタウロスボリンを含有するトニック5~9の作製。

エチルアルコール90g、1, 3-ブチレングリコール5g、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル0.5gおよびポリオキシエチレン(25)グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル0.25gを混合した液に、スタウロスボリンを $1 \times 10^{-6}$ g、 $3 \times 10^{-6}$ g、 $1 \times 10^{-5}$ g、 $3 \times 10^{-5}$ gまたは $1 \times 10^{-4}$ g添加し、均一に混合攪拌することにより、5種類の溶液を調製した。

【0037】これら溶液に精製水4.22gを攪拌しながら加え均一にし、スタウロスボリンを0.02 $\mu$ M(組成物5)、0.06 $\mu$ M(組成物6)、0.2 $\mu$ M(組成物7)、0.6 $\mu$ M(組成物8)、2 $\mu$ M(組成物9)含むトニックを調製した。

【0038】試験例1. マウス毛包細胞培養に対する促進効果。

毛包細胞の分離および培養はTanigakiらの方法[アーカイブズ・オブ・デルマトロジカル・リサーチ(Archives of Dermatological Research), 284, 290-296(1992)]を改変して行った。即ち、4日令のC3Hマウス(日本チャールス・リバーより購入)の背部皮膚を採取し、該皮膚を500単位/mlのディスパーゼ(合同酒清)および5%FCSを含むMEM培地[Minimum Essential Medium; Eagle]で4℃、16時間処理した。

【0039】該皮膚切片から表皮を剥離し得られた真皮層を0.25%コラゲナーゼN-2(新田ゼラチン)および10%FCSを含むDMEM培地[Dulbecco's Modified Eagle Medium]で37℃、1時間処理し、真皮懸濁液を得た。該真皮懸濁液を212ミクロンのナイロンメッシュ(日本理化学器械)で濾過後、該濾液を1000rpmで5分間遠心分離処理し、毛包組織を含むペレットを得た。

【0040】該ペレットに、カルシウム・マグネシウムフリーPBS[Dulbecco's Phosphate-Buffered Salin

e) 溶液を加え、ピペットを用いて懸濁後、15分間静置することにより毛組織を沈降させた。得られた毛組織を用いて、上記ペレットで行った、カルシウム・マグネシウムフリーPBS溶液の添加、ピペットによる懸濁、15分間静置・沈降操作と同様の操作を3回繰り返した。

【0041】得られた毛組織に0.1%EDTA-0.25%トリプシン液(ギブコ社製)を加え、37℃で5分間処理後、10%FCSを含むDMEM培地を加え、 $3 \times 10^5$ /mlの細胞濃度の毛組織細胞液を調製した。該毛組織細胞液を24穴コラーゲンコートプレート(イフキガラス社製)へ1ml/ウェルずつ播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で24時間培養を行った。

【0042】培養後、MCDB153培地(極東製薬社製)にウシインシュリン(シグマ社製)5mg/L、マウスEGF(宝酒造社製)5 $\mu$ g/L、ウシ下垂体抽出物(極東製薬社製)40mg/L、ヒトトランスフェリン(シグマ社製)10mg/L、ハイドロコチゾン(シグマ社製)0.4mg/L、プロゲステロン(コラボラティブ リサーチ社製)0.63 $\mu$ g/L、O-ホスホエタノールアミン(シグマ社製)14mg/L、エタノールアミン(シグマ社製)6.1mg/L、ベニシリン(和光社製)50U/ml、ストレプトマイシン(和光社製)50 $\mu$ g/mlおよび本発明でいうPKC阻害剤を含むDMSO溶液(培地に対し1/100体積加えた)を添加した培地へ培地交換し、さらに、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で5日間培養を行った。なお培地は1日おきに交換した。

【0043】なお、上記培地において、PKC阻害剤を含むDMSO溶液の代わりにDMSOのみを1/100体積培養液に加えた培地で培養したものを対照群とした。細胞増殖度の測定は、ニュートラルレッドを用いた方法[ジャーナル オブティッシュカルチャー メソッド(Journal of Tissue Culture Method), 9, 1, 7-9 (1984)]を参考に行った。

【0044】培養後の培地を吸引し、50mg/Lのニュートラルレッド（シグマ社製）を添加したMCDB153培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>下3時間培養を行った。培養上清を除去した後、得られた培養細胞を1%塩化カルシウムを含む1%ホルマリン溶液で1分間洗浄・固定を行った。洗浄・固定後、上清を除去し、1%酢酸を含む50%エタノール溶液（0.4ml/1穴=2cm<sup>2</sup>）を添加し、ニュートラルレッドを抽出した。

【0045】該抽出液の540nmでの吸光度を測定することにより細胞の増殖度を求めた。本発明における化

合物の増殖促進活性を第2表に示した。本発明における化合物は著しいマウス毛包細胞増殖促進効果を示した。また、PKA-IC<sub>50</sub>/PKC-IC<sub>50</sub>が3より小さいプロテインキナーゼ阻害剤であるK252aおよびスタウロスポリンを用いて同様に測定した結果を第3表に示した。該プロテインキナーゼ阻害剤はマウス毛包細胞の増殖を抑制した。

【0046】

【表2】

第2表

検体	濃度 ( $\mu$ M)	対照群の増殖を100としたときの相対増殖度
ポリミキシンB硫酸	10	360
カルフォスチンC	0.1	160
バルミール-DL-カルニチン塩酸	10	170

【0047】

【表3】

第3表

検体	濃度 ( $\mu$ M)	対照群の増殖を100としたときの相対増殖度
K252a	$1 \times 10^{-5}$	80
	$1 \times 10^{-4}$	77
	$1 \times 10^{-3}$	76
	$1 \times 10^{-2}$	29
	$1 \times 10^{-1}$	0
スタウロスポリン	$1 \times 10^{-5}$	78
	$1 \times 10^{-4}$	69
	$1 \times 10^{-3}$	72
	$1 \times 10^{-2}$	34
	$1 \times 10^{-1}$	0

【0048】試験例2. マウスの発毛に対する効果。

小川らの方法〔ザ・ジャーナル・オブ・デルマトロジー（The Journal of Dermatology）、10巻、45～54頁、1983年〕を参考に、マウスによる発毛効果の試験を行った。毛周期の休止期にある9週令のC3H/HeS1c雄性マウス（一群4～5匹）の背部毛を電気バリカンと電気シェーバーで注意深く剃毛し、実施例1～4および参考例2で作製した組成物1～9を一日一回、剃毛部に200 $\mu$ lずつ均一に塗布した。

【0049】本発明のプロテインキナーゼ阻害剤を含有しない以外は、実施例で示した組成と同一組成の組成物を用いて、同様に操作したものを対照群とした。試験塗布開始後18日目のマウス背部皮膚を採取し、写真撮影を行った後、画像処理装置（アビオニクス社製、スピカII）を用いて背部皮膚全面積に対する発毛部の面積の100分率を求め、被検薬剤群の発毛率の値から対照群の発毛率の値を差し引いた値を増加発毛面積率（%）とし

た。

【0050】結果を第4表および第5表に示した。第4表で示したように、本発明のプロテインキナーゼC特異的阻害剤を含有する育毛剤（組成物1～4）では、著しいマウスの毛包成長促進効果が認められた。それに対し、第5表で示したように、PKA-IC<sub>50</sub>/PKC-IC<sub>50</sub>の値が3以下のプロテインキナーゼ阻害剤スタウロスポリンを含有する組成物5～9では、該促進効果はほとんど全く認められなかった。

【0051】

【表4】



第 4 表

組成物	増加発毛面積率 (%)
組成物 1	5 8
組成物 2	6 5
組成物 3	5 1
組成物 4	7 0

【0052】

【表5】

第 5 表

組成物	スクワロレン濃度 ( $\mu$ M)	増加発毛面積率 (%)
組成物 5	0. 0 2	- 2
組成物 6	0. 0 6	- 5
組成物 7	0. 2 0	3
組成物 8	0. 6 0	- 8
組成物 9	2. 0 0	- 1 4

【0053】

【発明の効果】本発明によれば、プロテインキナーゼC特異的阻害剤を含む安全で有効な育毛剤を提供することができる。

1. The first part of the document is a list of the names of the persons who have been appointed to the various positions of the Board of Directors of the Corporation.

2. The second part of the document is a list of the names of the persons who have been appointed to the various positions of the Board of Directors of the Corporation.

3. The third part of the document is a list of the names of the persons who have been appointed to the various positions of the Board of Directors of the Corporation.